

肝硬化患者红细胞膜抗溶性增强对淋巴细胞亚群检测的干扰及纠正

何东元¹, 魏崇莉², 柴翠翠^{1△}, 张文婷¹, 周文慧¹, 李 丽¹, 苟 莹¹ (1. 中国人民解放军第一医院输血科, 兰州 730000; 2. 兰州军区机关门诊部, 兰州 730000)

【摘要】 目的 探讨肝硬化患者标本抗溶性增强条件下淋巴细胞亚群检测时标本制备的最佳溶血条件。**方法** 用不同剂量的溶血素在不同溶血时间处理 34 例抗溶性增强的肝硬化患者标本, 观察在不同溶血条件下流式细胞仪获取的前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)下白细胞散点图的清晰程度, 同时测定 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞的百分比。**结果** 肝硬化患者红细胞膜抗溶性增强, 采用溶血素用量为 1 350 μ L、溶血时间为 10 min 淋巴细胞分群效果较好。**结论** 制备肝硬化患者淋巴细胞亚群标本时, 增加溶血素用量, 检测结果的准确性增强。

【关键词】 肝硬化; 淋巴细胞亚群; 溶血素; 流式细胞术

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 08. 011 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)08-1035-02

Interference and correction of erythrocyte membrane anti-hemolytic enhancement in patients with liver cirrhosis on lymphocyte subset detection HE Dong-yuan¹, WEI Chong-li², CHAI Cui-cui^{1△}, ZHANG Wen-ting¹, ZHOU Wen-hui¹, LI Li¹, GOU Ying¹ (1. Department of Blood Transfusion, First Hospital of PLA, Lanzhou, Gansu 730000, China; 2. Organization Outpatient Department of Lanzhou Military Region, Lanzhou, Gansu 730000, China)

【Abstract】 Objective To explore the best hemolysis condition of specimen preparation under the condition of specimen anti-hemolysis increase in the patients with liver cirrhosis. **Methods** Different doses of hemolysin were used to treat the anti-hemolysis enhanced specimens from 34 cases of liver cirrhosis in different hemolytic time. The clear degree of WBC scatter diagram under FSC and SSC obtained by cytometry was observed under different hemolytic conditions. Meanwhile the percentages of T, B and NK lymphocyte subsets were detected. **Results** The anti-hemolysis of erythrocyte membrane in the patients with liver cirrhosis was enhanced. When hemolysin amount was 1 350 μ L and the hemolytic time was 10 min, the classification results of lymphocyte subsets were better. **Conclusion**

In preparing the lymphocyte subset specimen in the patients with liver cirrhosis, increasing the hemolysin dosage enhances the accuracy of detection results.

【Key words】 liver cirrhosis; lymphocyte subset; lysing solution; flow cytometry

在对临床患者进行淋巴细胞亚群检测时, 发现肝硬化患者标本经常出现溶血不完全, 结果检测不出的情况。为找出肝硬化患者标本的最佳溶血条件, 本研究应用 Becton Dickinson (BD) 公司生产的流式细胞仪 (FACS Calibur II), 对 34 例肝硬化患者的标本制备进行比较分析, 发现当溶血素用量为 1 350 μ L, 溶血时间为 10 min 时, 标本制备较好, 现将实验结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 7 月至 2015 年 6 月本实验室制备淋巴细胞亚群标本时溶血不完全、结果检测不出的肝硬化患者病例 34 例, 为本院住院或门诊肝硬化患者。病例均无自身免疫学疾病, 且肝硬化的诊断均符合 2000 年全国 (西安) 病毒性肝炎及肝病学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》的诊断标准。男 16 例, 女 18 例, 平均年龄 (48.9 $\pm$ 8.3) 岁。各组在年龄、性别间具有均衡性。

1.2 仪器与试剂 BD FACSCalibur 型流式细胞仪, 安徽中科中佳 KDC-1044 台式低速离心机, XK96-B 型快速混匀器, Thermo Scientific Finnpiptette F3 单道移液器 (1 000、200、20 μ L), 流式细胞专用试管 (BD Trucount 试管); CaliBRITE Beads, 鞘液, BD MultitestTM IMK 试剂盒 (包括 BD Multitest

CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, BD Multitest CD3 FITC/CD16⁺ CD56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC, BD MultitestTM IMK 试剂盒 10 倍浓缩溶血素), Calibrite beads 试剂盒 (BD Calibrite 3 和 APC 微球)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 顺利抽取肝硬化患者静脉血 2 mL 于 4 mL 肝素抗凝管中。

1.3.2 标本的制备 取 50 μ L 肝素抗凝血分别放入 2 支 12 mm $\times$ 75 mm 管中, 用字母 A 和 B 区分这 2 支试管。分别将 20 μ L 的 BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 试剂和 20 μ L 的 BD Multitest CD3/CD16⁺CD56/CD45/CD19 试剂移取到 A 管和 B 管的底部。涡旋混匀, 室温避光孵育 15~20 min; 向各管中分别添加 675、900、1 125、1 350 μ L 的 1 $\times$ BD Multitest 溶血素, 充分混匀, 避光溶血 10 min 或者 15 min; 1 600 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 往各管中加 1 mL 的 PBS 溶液, 轻微震荡混匀。1 600 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 往各管里加入 500 μ L 含 1% 多聚甲醛的 PBS 悬浮细胞。

1.3.3 FACScomp 自动质控操作 使用 FACSCalibur 流式细胞仪, 激发光为氩离子 488、633 nm 的谱线, 使用 BD Calibrite beads 试剂盒 CaliBRITE 标准微球, 取试剂盒中的 Unlabeled

试剂和 APC 试剂各 1 滴加入到第 1 支装有 1 mL 鞘液的试管中,混匀。取 5 种试剂(FITC、PE、PerCP、APC、Unlabeled)各 1 滴加入第 2 支装有 3 mL 鞘液的试管中,混匀。应用 FAC-SComp 软件调节仪器 PMT 电压,荧光补偿,灵敏度等参数。

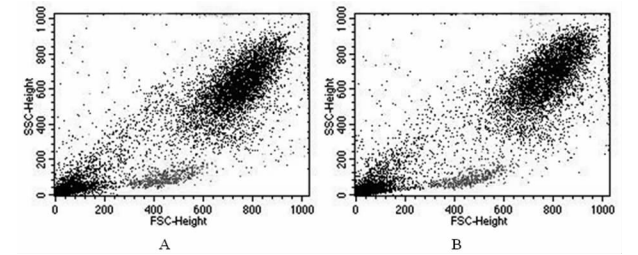
1.3.4 应用 Cell Quest Pro 软件分析标本 利用 Cell Quest Pro 软件获取数据,设 FSC 阈值,以前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)设门于各白细胞群体,以直方图分析淋巴细胞、单核细胞和粒细胞表面 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺、CD16⁺CD56⁺。

1.4 统计学处理 应用 SPSS16.0 统计软件进行结果分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,组间均数先进行方差齐性检验,然后 *t* 检验进行比较分析,比较各组间 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞之间的差异,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同溶血条件对白细胞散点图的影响 用不同浓度的溶血素溶血不同时间,观察标本发现溶血素用量为 675 μL 时,标本因溶血不充分而有混浊现象;当溶血素用量为 1 350 μL 时,标本澄清透亮,溶血效果较好。当溶血素用量相同溶血时间不同时,标本溶血后的透亮程度基本一致。标本处理好后,用流式细胞仪检测标本,利用 FSC 和 SSC 设门观察淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞的分群情况。溶血素用量为 675 μL 溶血 10 min 时,因溶血不充分导致红细胞碎片比较多,死细胞等杂质

的干扰大,FSC/SSC 的图中异常散射的颗粒较多,背景干扰大(图 1A);溶血素用量为 1 350 μL 溶血 10 min 时,红细胞碎片等的干扰相对比较小,杂质相对较少,背景相对比较干净(图 1B)。当溶血素用量一样,溶血时间为 10、15 min,白细胞散点图背景纯化的程度基本一致,红细胞碎片等干扰情况基本相似,无明显区别。



注:A 为溶血素 675 μL 溶血 10 min;B 为溶血素 1 350 μL 溶血 10 min。

图 1 白细胞 FSC/SSC 散点图

2.2 溶血条件不同对白细胞抗原表达的影响 溶血素用量分别为 675、900、1 125 μL 时,溶血 10 min 或者 15 min,T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞的检测结果与对照组相比差异均有统计学意义(*P* < 0.05);当溶血素用量增加至 1 350 μL 时,T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞的检测结果与对照组相比差异无统计学意义(*P* > 0.05),结果具体见表 1。

表 1 不同溶血条件下淋巴细胞检测结果分析($\bar{x} \pm s$, %)

项目	对照组	溶血 10 min				溶血 15 min			
		675 μL 溶血素	900 μL 溶血素	1 125 μL 溶血素	1 350 μL 溶血素	675 μL 溶血素	900 μL 溶血素	1 125 μL 溶血素	1 350 μL 溶血素
T 淋巴细胞 (CD3 ⁺)	64.48±0.43	57.25±0.40**	61.98±0.67**	66.12±0.49*	65.64±0.56	61.60±0.42**	60.72±0.64*	63.05±0.51*	65.57±0.53
B 淋巴细胞 (CD19 ⁺)	19.81±0.50	25.22±0.38**	24.87±0.48**	21.31±0.53*	20.88±0.42	22.80±0.44**	25.39±0.78**	21.64±0.46**	20.92±0.33
NK 细胞 (CD16 ⁺ 56 ⁺)	12.36±0.32	11.10±0.24**	9.04±0.14**	13.76±0.47**	11.84±0.25	11.09±0.26**	13.56±0.36*	13.36±0.29*	11.71±0.20

注:对照组结果源自于兰州市其他 2 家三甲医院平行对照的平均值;与对照组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01。

3 讨 论

流式细胞仪已用于科学研究和医学临床检验的各个领域,如免疫功能检查,肿瘤抗原、转移基因与抑癌基因及其他疾病相关基因检测、细胞凋亡、艾滋病诊断与预后判断等[1]。乙型肝炎患者机体不同的免疫状态与病程密切相关[2-4],CD4⁺和 CD8⁺细胞通过分泌白细胞介素(IL)-2、IL-10 等细胞因子参与机体的免疫应答,CD4⁺/CD8⁺比值可作为病毒复制水平的一项参考指标[5-7],因此通过淋巴细胞亚群分析患者的免疫状态,对检测患者的疾病状况辅助临床诊断有非常重要的意义[8]。

肝硬化患者由于疾病引起体内血液多样性的生化改变,如血液中胆红素浓度的改变,冷凝集素的形成,红细胞膜脂类异常等引起红细胞膜抗溶性增强[9-11],而产生抵抗溶血素的作用,导致红细胞溶血不完全,因此肝硬化患者在做淋巴细胞亚群检测时,常因溶血不充分而检测不出结果。

为了探究肝硬化患者淋巴细胞亚群标本制备的最佳溶血条件,本研究参考 BD 公司 MultiSET 四色免洗淋巴细胞亚群的绝对计数培训手册溶血 10 min 及淋巴细胞亚群检测试剂盒说明书里的溶血 15 min,试验加溶血素 675、900、1 125、1 350 μL 并均溶血 5、10、15 min 的溶血效果,发现溶血 5 min 时,红细胞裂解不完全标本混浊,检测不出结果。

从试验结果可以看出,当溶血素用量能充分溶解红细胞后,在一定范围内继续增加溶血时间,T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞的表达无显著差异。溶血素能很好地溶解红细胞,并且由于其成分中含有膜稳定剂能保护白细胞膜的完整、不受破坏,且保持白细胞膜抗原性不受影响,以利于白细胞表面标志物的检测[1,11-12],因此在一定范围内溶血时间对溶血效果的影响小于溶血素用量,且溶血素用量是淋巴细胞亚群检测中较为重要的因素。当溶血素用量不足时,红细胞裂解不充分,干扰白细胞表面抗原的检测;当溶血素用量增加到标准操作规程中的 1.5 倍即 675 μL 时,可检测出结果,但由于此条件下红细胞裂解不完全,红细胞碎片等杂质的干扰比较大,白细胞的散点图背景不纯;当溶血素用量增加到 1 350 μL 时,红细胞裂解充分,白细胞散点图中淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞的分群较好,死细胞等杂质的干扰较少背景相对较纯,检测结果也更为可靠。因此,在实际操作中处理抗溶性增强的肝硬化患者标本,从经济效益和工资本作效率出发,增加溶血素用量至 1 350 μL,溶血 10 min,即可获得较好的溶血效果。

综上所述,在制备肝硬化患者淋巴细胞亚群检测标本时,增加溶血素用量至 1 350 μL,溶血 10 min 情况下,红细胞裂解充分,残留红细胞减少,对亚群细胞分群计数(下转第 1039 页)

重度心功能不全的一个较好的特异标志物广泛应用于临床,在 2001 年的欧洲心脏协会(ESC)心功能不全诊断指南中已将 BNP 作为实验室检测指标纳入诊断指南中的主要项目^[6]。外源性 rhBNP 与内源性 BNP 有着相同的氨基酸序列和生物学效应,静脉输入后在体内代谢的半衰期为 18~22 min,停药 3 h (约 10 个半衰期)后即被基本清除^[7]。选择治疗后 3 d 的 BNP 水平来评价心力衰竭治疗效果能真实反映 rhBNP 疗效。

多巴胺为体内合成肾上腺素的前体,可明显改善肾血流量,增加尿量及正性肌力,小剂量多巴胺可为一些血压偏低的心力衰竭患者同时应用其他抗心力衰竭药物提供一个稳定血压及增加肾血流的治疗前提^[8]。

本研究结果显示,观察组患者治疗后总有效率(93.33%)明显高于对照组(73.33%),差异有统计学意义($P<0.05$),说明观察组治疗效果更显著;两组治疗后 LVEF 均有明显提高,同时两组患者心功能分级及 BNP 水平均较治疗前明显降低,说明治疗后两组患者的心功能水平均有不同程度的改善;两组患者治疗后血钠、血钾与治疗前比较差异无统计学意义($P>0.05$),说明两组患者治疗后的电解质平衡未被打乱;治疗后观察组不良反应的发生率与对照组差异无统计学意义($P>0.05$),且均未出现严重低血压或低血压休克,提示用药后两组患者虽均出现程度不同的不良反应现象,但并不严重,具有很高的安全性。

综上所述,治疗慢性重度心功能不全合并血压偏低,早期应用小负荷剂量 0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, rhBNP(常规推荐负荷剂量 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 减半)加维持剂量 0.007 5 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 联合小剂量多巴胺效果优于单纯维持剂量 0.007 5 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ rhBNP 联合小剂量多巴胺,且安全性高、不良反应少,值得临床推广

使用。

参考文献

[1] 都斌,姚雪艳.早期应用小剂量多巴胺联合呋塞米治疗心力衰竭的疗效[J].中国临床药理学杂志,2013,29(3):163-165.

[2] 黄河,梨清标.脉搏指示连续心排血量监测在治疗脓毒症休克合并心功能不全中的应用[J].广东医学,2014,35(6):883-885.

[3] 宋倩颖,张会超.BNP对感染性休克相关心功能不全的诊断价值[J].中国老年学杂志,2013,33(9):2183-2184.

[4] 吴利群.1例硝酸异山梨酯类药物致低血压休克患者的护理[J].中国实用护理杂志,2012,28(22):73-74.

[5] 郭牧,张云强,梁海青,等.左西孟旦联合重组人脑利钠肽治疗急性心力衰竭的临床研究[J].临床心血管病杂志,2014,30(4):286-290.

[6] 张炯,黄向阳,王苒,等.低氧血症对血浆氨基末端 B 型利钠肽的影响[J].安徽医科大学学报,2014,49(3):366-369.

[7] 潘海燕,朱健华,顾勇,等.脑利钠肽与多巴酚丁胺对心力衰竭患者疗效的影响[J].临床心血管病杂志,2013,29(11):857-861.

[8] 程文俊,席建军,牛云枫.脑利钠肽在原发性高血压中的研究进展[J].实用医学杂志,2014,30(4):650-652.

(收稿日期:2015-10-29 修回日期:2015-12-10)

(上接第 1036 页)

的影响降低,可以较为准确地检查患者的免疫指标,为临床提供可靠、准确的检测结果^[13]。

参考文献

[1] 肖东杰,李晓英,刘洋,等.一种自制流式细胞仪专用溶血素对红细胞和白细胞作用的研究[J].山东大学学报:医学版,2006,44(9):946-948.

[2] 原彤彤,玉艳红,吴继周.慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞百分比检测的临床意义[J].广西医科大学学报,2011,28(2):278-279.

[3] 张昭萍,唐勤.慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群及 NK 细胞检测的临床意义[J].江苏医药,2010,36(19):2319-2320.

[4] 丁巧云,俞海英,孙薇薇,等.小儿重型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化及临床意义[J].临床肝胆病杂志,2011,27(7):729-730.

[5] Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during Hepatitis B virus infection[J]. J Gen Virol, 2006, 87(Pt6):1439-1449.

[6] Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. The role of virus specific CD8⁺ cells in liver damage and viral control during per-

sistent Hepatitis B virus infection[J]. J Exp Med, 2009, 191(8):1269-1280.

[7] 何英,张允奇,吴润香,等.慢性乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群变化与病毒复制的关系[J].检验医学,2009,24(11):808-811.

[8] 梁志清,吴健林,吴继周,等.机体免疫状态对慢性乙型肝炎患者 HBsAg 和 HBV DNA 水平的影响[J].内科,2009,4(6):852-854.

[9] 郭洪晨.肝病患者白细胞检测常见的影响因素[J].中国现代医生,2008,46(11):57-58.

[10] 赵治风,贾秋龙.红细胞参数检测用于肝病患者的临床价值[J].临床合理用药,2012,5(48):110-111.

[11] 孙杨,丘江.106例重症肝病患者白细胞检测结果异常情况分析及原因分析[J].国际医学检验杂志,2010,31(7):754-755.

[12] 周春保,徐向升,徐若男,等.自制改进溶血素用于慢加急性肝衰竭患者免疫细胞的流式检验[J].中国病毒病杂志,2013,3(2):117-121.

[13] 刘峰,李冠武.重型肝炎血液学变化的临床分析[J].中国医师杂志,2004,6(3):334-335.

(收稿日期:2015-11-25 修回日期:2016-01-16)